

中华人民共和国国家标准

饲料中含硫氨基酸测定方法
——离子交换色谱法

GB/T 15399—94

Determination of sulfur amino acids in feedstuffs
—Ion exchange chromatography

1 主题内容与适用范围

本标准规定了饲料中含硫氨基酸的测定方法。
本标准适用于单一饲料、配合(混合)饲料及浓缩饲料。

2 引用标准

GB/T 6432 饲料粗蛋白质测定方法
GB/T 6439 饲料水溶氯化物测定方法

3 原理

饲料中的含硫氨基酸(胱氨酸、半胱氨酸和蛋氨酸)用过甲酸氧化并经盐酸水解生成磺基丙氨酸和蛋氨酸砒,此二产物可用离子交换色谱法分离测定。

4 试剂

除特别注明者外,所有试剂均为分析纯,水为去离子水,电导率小于1 MS。

4.1 过甲酸溶液

4.1.1 常规过甲酸溶液:将30%过氧化氢(GB 6684)与88%甲酸(HG 3—1296)按1:9(V/V)混合,于室温下放置1 h,置冰水浴中冷却30 min,临用前配制。

4.1.2 浓缩料用过甲酸溶液:将常规过甲酸溶液中按3 mg/mL加入硝酸银(GB 670)即可。此溶液适用于氯化钠含量小于3%的浓缩料。

当浓缩料中氯化钠含量大于3%时,氧化剂中硝酸银浓度可用下式计算:

$$C_R \geq 1.454 \times m \times C_N \dots\dots\dots(1)$$

式中: C_R ——过甲酸中硝酸银的浓度,mg/mL;
 C_N ——样品中氯化钠含量,mg/mL;
 m ——样品质量,mg。

4.2 氧化终止剂

4.2.1 48%氢溴酸(GB 621)

4.2.2 偏重亚硫酸钠溶液:33.6 g 偏重亚硫酸钠(HG 3—909)加水定容至100 mL。

4.3 酸解剂

国家技术监督局1994-12-30批准

1995-07-01实施

- 4.3.1 6.0 mol/L 盐酸溶液:将优级纯盐酸(GB 622)与水按 1:1(V/V)混合。
- 4.3.2 6.8 mol/L 盐酸溶液:将优级纯盐酸(GB 622)1133 mL 加水稀释重 2 000 mL。
- 4.4 7.5 mol/L 氢氧化钠溶液:取优级纯氢氧化钠(GB 629)30 g,加水溶解并定容至 100 mL。
- 4.5 稀释上机用柠檬酸钠缓冲液,pH 2.2,0.2 mol/L Na:称取柠檬酸三钠(HG 3—1298)19.6 g,用水溶解后加入优级纯盐酸 16.5 mL,硫二甘醇 5.0 mL,苯酚(HG 3—1165)1 g,最后加水定容至 1 000 mL,用 G4 垂熔玻璃砂芯漏斗过滤。
- 4.6 不同 pH 及离子强度的洗脱用柠檬酸钠缓冲液:按仪器说明书配制。
- 4.7 茚三酮溶液:取茚三酮适量,按仪器说明书配制。
- 4.8 磺基丙氨酸-蛋氨酸砷标准贮备液,2.50 $\mu\text{mol/mL}$:准确称取磺基丙氨酸 105.7 mg 和蛋氨酸砷 113.3 mg,加水溶解并定容至 250 mL。
- 4.9 氨基酸混合标准贮备液:含有 L-天门冬氨酸、L-苏氨酸等 17 种常规蛋白质水解分析用 L-氨基酸,各组份浓度为 2.50 $\mu\text{mol/mL}$ 。
- 4.10 混合氨基酸标准工作液:吸取磺基丙氨酸-蛋氨酸砷标准贮备液(4.7)和氨基酸混合标准贮备液(4.8)各 1.00 mL,置于 50 mL 容量瓶中,加稀释上机用柠檬酸钠缓冲液(4.4)定容,混匀。有关各组份浓度为 50 nmol/mL。

5 仪器、设备

- 5.1 实验室用样品粉碎机;
- 5.2 样品筛:孔径 0.45 mm(40 目);
- 5.3 分析天平:感量 0.0001 g;
- 5.4 喷灯;
- 5.5 旋转蒸发器或浓缩器:可在室温至 65 $^{\circ}\text{C}$ 间调温,控温精度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$,真空度可低至 $3.3 \times 10^3 \text{Pa}$ (25 mmHg 柱)。
- 5.6 恒温箱或水解炉;
- 5.7 氨基酸自动分析仪:要求蛋氨酸砷的分辨率大于 90%。

6 样品

取具有代表性的饲料样品,用四分法缩减分取 25 g 左右,粉碎并过 0.45 mm 孔径(40 目)筛,充分混匀后装入磨口瓶中备用。

7 分析步骤

7.1 氧化和水解:称取含蛋白质 7.5~25 mg 的试样双份(精确至 0.0001 g,样品量不超过 75 mg),置于旋转蒸发器 20 mL 浓缩瓶或浓缩管中,于冰水浴中冷却 30 min 后加入已经冷却的过甲酸溶液(4.2) 2 mL,加液时需将样品全部润湿,但不要摇动,盖好瓶塞,连同冰浴一道置于 0 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,反应 16 h。

以下步骤依使用不同的氧化终止剂而不同:

若以氢溴酸为终止剂,于各管中加入氢溴酸(4.1)0.3 mL,振摇,放回冰浴,静置 30 min,然后移到旋转蒸发器或浓缩器(5.5)上,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 、低于 $3.3 \times 10^3 \text{Pa}$ (25 mmHg 柱)下浓缩至干。用盐酸溶液(4.3.1)约 15 mL 将残渣定量转移到 20 mL 安瓿中,封口,置恒温箱中、110 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下水解 22~24 h。也可用 6.0 mol/L 盐酸溶液约 25 mL 将残渣转移到 50 mL 消煮管中,于水解炉中、110 $\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下回流水解 22~24 h。

取出安瓿或水解管,冷却,用水将内容物定量地转移至 50 mL 容量瓶中,定容。充分混匀,过滤,取 1~2 mL 滤液,置旋转蒸发器或浓缩器中,在低于 50 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,减压蒸发至干。加少许水重复蒸干 2~3 次。准确加入一定体积(2~5 mL)的稀释上机用柠檬酸钠缓冲液(4.5)振摇,充分溶解后离心,取上清

液供仪器测定用。

若以偏重亚硫酸钠为终止剂,则于样品氧化液中加入偏重亚硫酸钠溶液(4.2.2)0.5 mL,充分摇匀后,直接加入盐酸溶液(4.3.2)17.5 mL,置 $110 \pm 3^\circ\text{C}$ 水解 22~24 h。

取出水解管,冷却,用水将内容物转移到 50 mL 容量瓶中,用氢氧化钠溶液(4.4)中和至 pH 约 2.2,并用稀释上机用缓冲液(4.5)定容,离心,取上清液供仪器测定用。

如氨基酸分析受上机样品液中 Na^+ 浓度影响,色谱峰出峰时间漂移过大,则需先将水解液定容过滤,而后取 2~5 mL 滤液,于 50°C 下,减压蒸发至约 0.5 mL(切勿蒸干),用稀释上机用缓冲液(4.5)将其转移至 10 mL 容量瓶中,加氢氧化钠溶液(4.4)调至 pH 2.2,并用稀释上机用缓冲液(4.5)定容。混匀,离心,取上清液供仪器测定用。

浓缩料测定首先按 GB 6439 测定其 NaCl 含量。样品处理步骤同上,只是氧化剂使用 4.1.2。

7.2 测定:用混合氨基酸标准工作液(4.9),按仪器说明书,调整仪器的操作参数和(或)洗脱用柠檬酸缓冲液(4.5)的 pH,使蛋氨酸砷分辨率达最佳状态(大于或等于 90%),注入制备好的样品和氨基酸标准工作液(4.9),进行分析测定。每 5 个样品(即 10 个单样)为一组,组间插入混合氨基酸标准工作液(4.9)进行校准。

8 分析结果的表述

分析结果表示为胱氨酸和蛋氨酸在样品中的质量百分率,计算公式如下:

$$\text{胱(蛋)氨酸}(\%) = \frac{A}{m} \times 10^{-6} \times D \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

式中: A ——每毫升上机样品液中胱(蛋)氨酸的含量,ng;

m ——样品质量,mg;

D ——样品稀释倍数。

以两个平行样品测定结果的算术平均值报告结果,保留两位小数。

9 重复性

两个平行样品测定值的相对偏差,当胱(蛋)氨酸的含量小于 0.50%时,不大于 5%;大于 0.50%时,不大于 4%。

附加说明:

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由中国农业科学院分析测试中心[兼国家饲料质量监督检验中心(北京)]、中国农业科学院畜牧研究所和吉林省农业科学院大豆研究所共同起草。

本标准主要起草人常碧影、李建凡、张明、闫惠文、左江湾。